

参考文献:

- [1] 王莲, 吕芳, 张荣泉. 植物芦荟的化学成分、药理作用及应用的研究进展[J]. 天津药学, 2009, 21 (2): 63-65.
- [2] Hartmann G, Bidlingmaier C, et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 292(1): 22-30.
- [3] Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice [J]. Gastroenterology, 2003, 124 (5): 1381-1394.
- [4] Siegmund B, Zeitz M. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. World J gastroenterol, 2011, 17(27): 3178-3183.
- [5] Sad S, Marcotte R, Mosmann T, et al. Cytokine induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines[J]. Immunity, 1995, 2(3): 271-279.
- [6] Macdonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(1): 2-9.
- [7] 李新, 温寅飞, 等. 芦荟大黄素对白细胞介素-2引起大鼠T细胞增殖和细胞内Ca²⁺浓度变化的影响[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2027-2030.
- [8] 李锦山, 李国辉, 等. 芦荟大黄素对大鼠实验性急性胰腺炎的作用[J]. 中国医药导报, 2009, 6(6): 14-15.
- [9] Wang LJ, Cao Y, Shi HN. Helminth infections and intestinal inflammation[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(33): 5125-5132.
- [10] Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease [J]. N Engl J Med, 2004, 351 (20): 2069-2079.

(编辑: 邓响潮)

补骨脂 4 种组分对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子的影响

柴丽娟¹, 王安红², 徐金虎², 王虹¹, 王少峡¹, 张晗¹, 张晓霞² (1. 天津中医药大学 天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193; 2. 天津中医药大学方剂学教育部重点实验室, 天津 300193)

摘要: 目的 探讨补骨脂 4 种组分补骨脂素、corylifol A、新补骨脂异黄酮、补骨脂酚对巨噬细胞 RAW264.7 细胞炎症因子的影响。方法 ELISA 法测定补骨脂 4 种组分对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-6 分泌的影响及雌激素受体抑制剂(ICI 182.170)的拮抗作用。结果 与正常对照组比较, 脂多糖(LPS)组可以显著升高 RAW264.7 细胞表达 TNF- α , IL-1 β , IL-6($P < 0.05$); corylifol A、补骨脂酚在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能显著降低 TNF- α 的分泌($P < 0.05$); 补骨脂素、corylifol A、新补骨脂异黄酮在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能显著降低 IL-1 β 的分泌($P < 0.05$); corylifol A、新补骨脂异黄酮、补骨脂酚在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下显著降低 IL-6 的分泌。补骨脂 4 种组分的抗炎作用与补骨脂雌激素样活性无关。结论 补骨脂 4 种不同组分对 LPS 刺激引起的炎症因子的释放有抑制作用, 其抗炎作用与雌激素受体样活性无关。

关键词: 补骨脂素; corylifol A; 新补骨脂异黄酮; 补骨脂酚; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6; 雌激素样作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0360-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.009

Inhibition of Inflammatory Cytokines in the LPS-induced RAW264.7 Cells by Four Components from Fructus Psoraleae

CHAI Lijuan¹, WANG Anhong², XU Jinhui², WANG Hong¹, WANG Shaoxia¹, ZHANG Han¹, ZHANG Xiaoxia² (1. Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To explore the effects of four components of psoralen, corylifol A, neobavaisoflavone, bakuchiol from Fructus Psoraleae on the inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells. **Methods** ELISA was adopted to examine the effect of the four components on the secretion of inflammatory cytokines of TNF- α ,

收稿日期: 2013-03-07

作者简介: 柴丽娟, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: cljuan1258@163.com。

基金项目: 科技部国际合作项目(2008DFB30070); 国家自然科学基金项目(81102860); 天津市卫生局科技基金项目(2010KZ118)。

IL-1 β , IL-6, and on counteracting the inhibition of ICI182.170 by estrogen receptor. **Results** Compared with the normal control group, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in RAW264.7 cells were significantly increased by LPS ($P < 0.05$), TNF- α level was significantly decreased by corylifol A, and bakuchiol at 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and IL-1 β secretion was significantly decreased by psoralen, corylifol A and neobavaisoflavone ($P < 0.05$) at 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Simultaneously, IL-6 expression was also decreased by corylifol A neobavaisoflavone and bakuchiol ($P < 0.05$) at 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The anti-inflammatory action of the four components from Fructus Psoraleae had no correction with estrogen-like activity of Fructus Psoraleae. **Conclusion** The four components from Fructus Psoraleae have the inhibitory effect on inflammatory cytokines release in the LPS-induced RAW264.7 cells, and the effect has no correlation with the estrogen receptor.

Keywords: Psoralen; Corylifol A; Neobavaisoflavone; Bakuchiol; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6; Estrogen-like activity

据流行病学和临床大量资料显示, 雌激素对防止动脉粥样硬化(AS)有一定作用, 但有可能引发如深静脉血栓、脑卒中等危险事件^[1]。炎症在 AS 中扮演着重要角色, AS 斑块从开始、发展到形成过程中, 巨噬细胞、T 淋巴细胞、肥大细胞等免疫细胞产生大量的炎症分子及蛋白水解酶, 这些分子降解细胞外基质威胁斑块稳定性。AS 后期引起如冠心病、短暂性脑缺血、脑血栓、脑出血、老年痴呆等, 使心脑血管疾病的致死率、致残率上升^[2]。补骨脂为豆科植物补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 果实, 性温, 味辛, 具补肾助阳功效。历代医家将其广泛的应用于各类补肾健骨的方剂中^[3]。近年来补骨脂的雌激素样作用逐渐被国内外研究者所关注。如赵丕文等^[4-5]利用雌激素受体(ER)阳性 MCF-7 细胞的增殖实验表明补骨脂具有拟雌激素作用, 在与雌激素同时用药时具有抗雌激素作用, 其双向调节效应依赖于体内雌激素水平的高低。课题组前期研究^[6]也表明, 补骨脂素可以与雌激素受体发生作用, 具有拟雌激素活性。本文探讨补骨脂的 4 种组分补骨脂素、corylifol A、新补骨脂异黄酮、补骨脂酚对脂多糖(LPS)刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响, 了解补骨脂抑制炎症因子释放、减缓 AS 的作用机制, 同时也为临床治疗 AS 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 补骨脂, 河南省药品公司; 补骨脂 4 种组分由天津中医药大学中医药研究院自提; 不同成分用 DMSO 溶解成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。LPS (*Escherichia coli* serotype)、DMEM、DMSO、雌激素受体抑制剂(ICI182.170), 美国 Sigma 公司; 热灭活血清、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 试剂盒, 美国 R&D 公司; RAW264.7, 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 倒置相差显微镜, 日本 OLYMPUS;

CO₂ 恒温培养箱, 美国 THERMO 公司; 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠源性巨噬细胞 RAW264.7 用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO₂ 培养箱中培养, 待细胞生长至 90 % 时, 将细胞刮下, 以一定比例稀释计数后种板。传代比例为 1 : 5。细胞传代不超过 20 代。

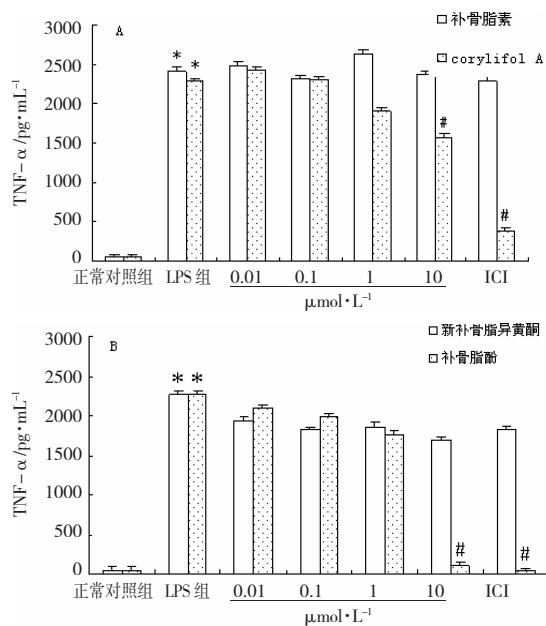
细胞种入培养板后长满约 70 % 后加入 LPS 刺激, 同时加入药物, 24 h 后收集细胞培养液上清进行 ELISA 试剂盒检测。细胞分为正常对照组(含 1 % DMSO), LPS 组($62.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 补骨脂 4 种组分不同浓度组 (0.01 , 0.1 , 1 , $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物 + $62.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS), ICI 组(ICI 在加入药物之前 $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预孵育 2 h, 而后加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 补骨脂素组分 + $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICI + $62.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS)。

1.2.2 酶联免疫反应 将待测样品上清收集后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 轻轻取出离心上层, 由酶联免疫吸附法测得, 操作步骤严格按照试剂盒所附说明书进行。自动酶标仪 450 nm 处检测。试验重复 3 次。

1.3 统计学处理方法 SPSS11.5 统计学软件处理, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 补骨脂 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 TNF- α 的影响 见图 1。TNF- α 酶联免疫结果表明, 与正常对照组比较, LPS 组可以显著升高 RAW264.7 细胞表达 TNF- α , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); corylifol A、补骨脂酚在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能显著降低由 LPS 引起的 TNF- α 的分泌, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而补骨脂素、新补骨脂异黄酮无此作用。并且 corylifol A、补骨脂酚的抑制作用



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 1 补骨脂素 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 1 Effects of Psoralen four components on TNF- α production by LPS induced RAW264.7

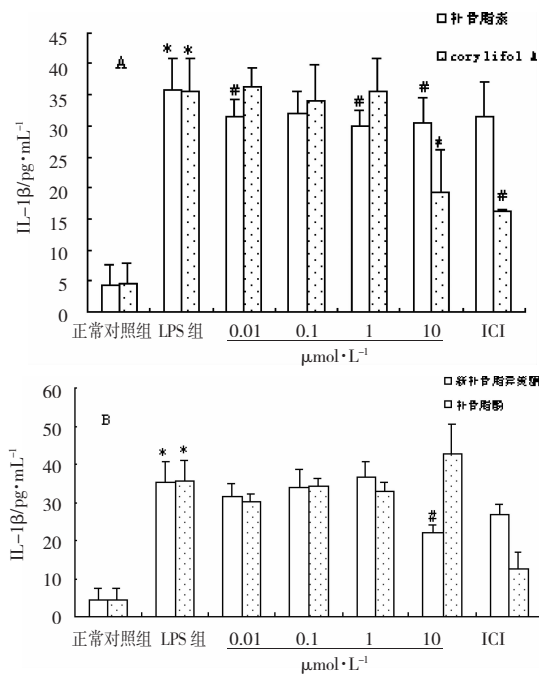
与雌激素样作用无关。

2.2 补骨脂 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 IL-1 β 的影响 见图 2。IL-1 β 酶联免疫结果表明，与正常对照组比较，LPS 组可以显著升高 RAW264.7 细胞 IL-1 β 的分泌 ($P < 0.05$)；补骨脂素、corylifol A、新补骨脂异黄酮在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下能显著降低 IL-1 β 的分泌，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其抑制作用与雌激素样活性无关。

2.3 补骨脂 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 IL-6 的影响 见图 3。IL-6 酶联免疫实验表明，与正常对照组比较，LPS 组可以显著升高 RAW264.7 细胞 IL-6 的表达 ($P < 0.05$)；与 LPS 组比较，corylifol A、新补骨脂异黄酮、补骨脂酚在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著降低由 LPS 诱导的 IL-6 的分泌，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样，它们的抑制作用与雌激素样活性无关。

3 讨论

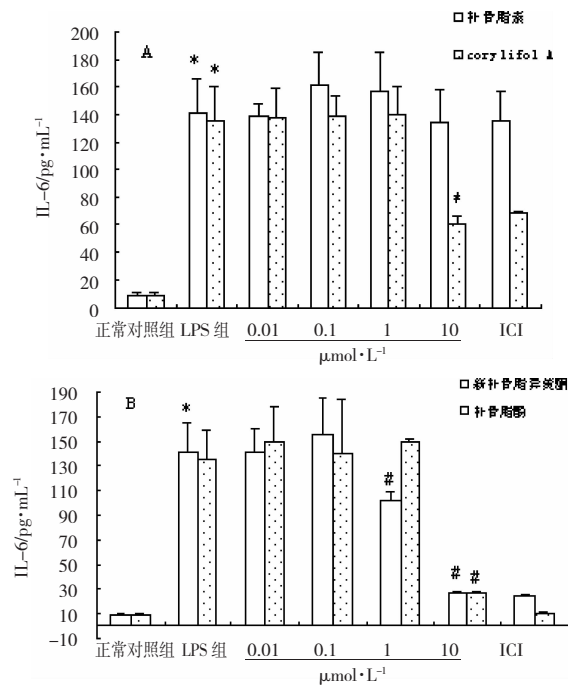
雌激素可以延缓动脉硬化的形成。雌激素可通过直接效应改善内皮细胞和血管平滑肌细胞功能，抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移；其间接效应改善脂代谢、血流动力学和凝血纤溶系统功能等，从而改善血管功能；也可明显引发深静脉血栓、脑卒中等其他危险事件。



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 2 补骨脂素 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 IL-1 β 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effects of Psoralen four components on IL-1 β production by LPS induced RAW264.7



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 3 补骨脂素 4 种组分对 LPS 诱导 RAW264.7 释放 IL-6 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3 Effects of Psoralen four components on IL-1 β production by LPS induced RAW264.7

补骨脂作为温肾助阳中药，在治疗妇科疾病方面应用已久。本课题组前期实验^[6]发现，补骨脂素及

补骨脂酚具有较强的雌激素受体亚型选择性, 补骨脂素选择性激活 $ER\alpha$, 而补骨脂酚具有强 $ER\beta$ 选择性。赵丕文, 韦妍妍等^[4,7]的研究结果表明补骨脂素具有雌激素活性, 其作用通过雌激素受体介导。

AS 斑块形成过程中包括内皮细胞损伤、黏附因子释放, 白细胞活化及穿透内皮转变成巨噬细胞、泡沫细胞等过程, 都始终有 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 等炎症因子的大量分泌。 $IL-1\beta$ 可启动级联反应, 引起巨噬细胞、中性粒细胞的招募、活化、血管扩张、发热和有效的前炎症免疫反应, 致使内皮细胞表达黏附分子, 引起单核细胞和 T 淋巴细胞募集、浸润, 启动动脉粥样硬化形成; $IL-6$ 作为多功能炎症因子参与了感染的急性期反应, 促使肝脏合成急性时相蛋白, 激活巨噬细胞和 T 淋巴细胞, 促进血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的增生。 $IL-6$ 也同时调节脂类代谢、影响内皮功能和促凝作用。这些炎症因子共同作用将导致局部的血黏度增加, 促凝状态增强, 促进 AS 的形成。

本研究表明, 补骨脂 4 种有效组分对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生的 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 有不同程度的抑制作用, 其中以 corylifol A 效果最佳。表明补骨脂 4 种组分可以不同程度降低炎症因子的表达。这与以往关于补骨脂可以改善初老小鼠体内雌激素水平^[8]、降低去卵巢大鼠体质量和血甘油三酯的水平^[9]、治疗冠心病、心绞痛^[10]、扩冠作用^[10]等报道

一致。本研究提示, 补益类中药补骨脂能抑制炎症因子的过度释放, 是其降低 AS 的危险可能性的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 刘欣, 殷惠军. 雌激素与动脉粥样硬化[J]. 医学综述, 2012, 8(18): 1124-1127.
- [2] Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. Circulation, 2001, 4: 2673-2678.
- [3] 黄剑, 赵陆华, 邹巧根, 等. 补骨脂化学成分及药理研究进展[J]. 药学进展, 2000, 24(4): 212-214.
- [4] 赵丕文, 王大伟, 牛建昭, 等. 红花等 10 种药物的植物雌激素活性研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 436-439.
- [5] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 异补骨脂素的植物雌激素作用及其机制的探讨[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(9): 193-197.
- [6] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity[J]. Phytomedicine, 2010, 17(2): 126-131.
- [7] 韦妍妍, 张紫佳, 徐颖, 等. 补骨脂对去卵巢大鼠雌激素样作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 158-161.
- [8] 巴文君, 孙丽萍, 张秋菊, 等. 补骨脂对初老小鼠体内雌孕激素水平作用实验研究[J]. 中医药学报, 2010, 38(5): 19-21.
- [9] 常燕琴, 朱家恩, 白延斌, 等. 补骨脂对去卵巢大鼠体重及脂代谢的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 2880-2881.
- [10] 梁明星. 补骨脂治疗老年冠心病心绞痛临床分析[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(3): 283-283.

(编辑: 邓响潮)

益肾通对前列腺炎及前列腺增生组织学的影响

邱云桥, 祝常德, 李信平, 孟磊, 魏宗彬, 王志刚, 王小俊, 陈铭 (广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405)

摘要: **目的** 观察益肾通胶囊(YST)对小鼠前列腺炎及前列腺增生组织学变化的影响。**方法** 雄性 KM 小鼠随机分为 7 组, 即正常对照组(Normal)、前列腺炎组(CNP)、前列腺增生组(BPH)、前列腺炎合并前列腺增生组(CNP+BPH)、前列腺炎干预组(CNP-YST)、前列腺增生干预组(BPH-YST)、前列腺炎合并前列腺增生干预组(CNP+BPH-YST)。除正常对照组外, 其余各组动物分别按照相应的造模方法复制模型。各干预组每天均灌胃给予益肾通 ($1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 正常对照组、模型组同时予等容积蒸馏水灌胃。于第 28 天全部断颈处死小鼠, 取其前列腺组织行病理学检查, 采用免疫组化法检测各组小鼠前列腺组织 IL8、Ki67 抗原表达。**结果** CNP+BPH 组 Ki67-LI (73.20 ± 5.94) 高于 BPH 组 (51.20 ± 4.20), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); CNP-YST 组 IL8-LI (13.90 ± 1.91) 低于 CNP 组 (44.10 ± 3.67), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); BPH-YST 组 IL8-LI (18.07 ± 2.05) 与 BPH 组

收稿日期: 2013-03-28

作者简介: 邱云桥, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合泌尿外科及男科工作。Email: yunqiaoq@163.com。通讯作者: 祝常德, 博士研究生, 研究方向: 泌尿外科及男科。Email: 529089159@qq.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(粤科函社字[2010]1096 第 131 号)。